

IZOLACIJA BAKTERIJA REZISTENTNIH NA METALE IZ ZEMLJIŠTA
ISOLATION OF METAL RESISTANT BACTERIA FROM SOIL

Autor: Lazar Milin

XIV Beogradska Gimnazija - II godina
Regionalni centar za talente Beograd II

Mentor: dr Ivana Morić, naučni saradnik

Laboratorija za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvom, Univerzitet u Beogradu

Laboratory for Microbial Molecular Genetics and Ecology
Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade

REZIME

Zagađenje zemljišta teškim metalima je ozbiljan ekološki problem, pošto teški metali imaju veliki negativan uticaj na sve organizme, uključujući i čoveka. Brojne fizičko-hemijske metode se primenjuju u uklanjanju teških metala iz zagađenih sredina, ali su one uglavnom skupe i neefikasne.

Bioremedijacija je, naprotiv, vrlo efikasan i ekonomski prihvatljiv pristup rešavanja problema zagađenja zemljišta metalima. Mikroorganizmi mogu da akumuliraju i imobilizuju teške metale, te se smatraju ključnim faktorom u procesu bioremedijacije.

Cilj ovog rada je bio izolacija mikroorganizama rezistentnih na teške metale iz potencijalno zagađenog gradskog zemljišta (Kalemegdanski park). Urađena je hemijska analiza uzorka i utvrđeno je prisustvo olova (30 mg/l) i cinka (1 mg/l) u granicama dozvoljenih količina za te metale. Na Metal Toxicity medijumu, u prisustvu Pb u koncentraciji od 100 mg/l (maksimalna dozvoljena količina), izolovano je 26 bakterija, koje su testirane na dva, pet i deset puta veće koncentracije olova. Od 26 testiranih bakterija 22 su bile rezistentne na 1g/l olova. Dalja analiza ovih bakterija će pokazati njihov potencijal za primenu u procesu bioremedijacije.

Ključne reči: zagađenje zemljišta, teški metali, bioremedijacija, izolacija bakterija

SUMMARY

Pollution of soil with heavy metals is a great ecological problem, due to their strong negative effects on all living organisms, including humans. Numerous physical and chemical methods are employed in their removal from polluted areas, most of them very expensive and inefficient.

Bioremediation is, on the contrary, a very efficient and cost-effective solution to the soil pollution problem. Microorganisms are able to accumulate and immobilize heavy metals, so they are considered a key factor in the process of bioremediation.

The goal of the research was to isolate microorganisms from potentially polluted soil (Kalemegdan park). The chemical analysis of the sample found 30mg/l of lead and 1mg/l of zinc. Both results were within the limits of permitted amounts for these metals. On Metal Toxicity medium in the presence of 100 mg/l of lead (the legal limit for Pb in soil) 26 bacteria were isolated, which were then tested on two-, five- and ten- fold greater concentration of lead. Of the

26 tested bacteria 22 showed resistance to 1g/l of lead. Further analysis of these bacteria will show their potential for use in the field of bioremediation.

Keywords: soil pollution, heavy metals, bioremediation, bacterial isolation.

UVOD

Ogromne količine neorganskih jedinjenja dospeva u zemljište svake godine kao rezultat aktivnosti ljudi (1). Teški metali, kao što su Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Cu i Zn, često predstavljaju ozbiljnu pretnju prirodnoj sredini i ljudskom zdravlju zbog svoje toksičnosti i uključivanja u lanac ishrane (2). Kako teške metale nije moguće razgraditi i kako su tradicionalne metode uklanjanja teških metala iz spoljašnje sredine skupe i nose rizik, zbog mogućnosti stvaranja štetnih nus-proizvoda, jedini pravi način uklanjanja teških metala je bioremedijacija.

Bioremedijacija je najefikasniji i ekonomski najisplativiji pristup rešavanju problema zagađenja zemljišta teškim metalima (3). Sa jedne strane, kada su teški metali prisutni u visokim koncentracijama u zemljištu veoma su toksični za zemljišne mikroorganizme i utiču na strukturu, diverzitet i biohemijsku aktivnost njihove zajednice. Sa druge strane, izloženost teškim metalima rezultuje formiranjem rezistentne mikrobiološke zajednice (4), koja može imati značajnu ulogu u sopstvenom oporavku.

Iako se najčešće razmatra bioremedijacija zemljišta zagađenog u oblastima industrijskih zona, treba imati u vidu da je i u velikim gradskim sredinama zemljište, uključujući parkove zagađeno teškim metalima, što je i pokazala trogodišnja studija Ministarstva za zaštitu životne sredine, rudarstva i prostornog planiranja Republike Srbije(5).

Cilj ovog rada je bila izolacija bakterija rezistentnih na metale iz zemljišta beogradskog parka, potencijalno zagađenog teškim metalima, dok su specifični ciljevi bili: 1) određivanje broja prisutnih bakterija u odabranom zemljištu, 2) hemijska analiza uzoraka – utvrđivanje prisustva i koncentracije potencijalno štetnih metala, 3) izolovanje bakterija rezistentnih na metale čije prisustvo je utvrđeno hemijskom analizom i 4) ispitivanje odabranih izolata na povišene koncentracije metala.

MATERIJAL I METODE RADA

Mesto uzimanja uzorka

Uzorak zemljišta je uzet u parku Kalemegdan, u neposrednoj blizini prometne ulice. Po uzorkvanju, zemljište je, u sterilnim plastičnim posudama, transportovano do laboratorije i držano na +4°C do analiziranja.

Priprema uzorka zemljišta za zasejavanje na medijume za gajenje bakterija

Jedan gram zemljišta je bio resuspendovan u 100 ml 50 mM PBS pH 7.6 (*eng.* Phosphate Buffered Saline) i snažno mućkan 10 minuta. Potom je suspenzija ostavljena 30 minuta, što je omogućilo da se čestice zemljišta stalože. Nakon toga odlivena je gornja, vodena faza u kojoj su se nalazile bakterije. Ovo razblaženje od sto puta (1 g zemljišta u 100 ml PBS; 10^{-2} razblaženje) je dalje korišćeno za pravljenje daljih razblaženja (10^{-3} , 10^{-4}) koja su korišćena za zasejavanje i određivanje ukupnog broja bakterija u jednom gramu zemljišta, kao i za zasejavanje na podloge koje su sadržale metale.

Sastav 50mM PBS-a, pH7.6: 5.1 ml M NaH_2PO_4 , 44.9 ml 1M Na_2HPO_4 , 30 ml 5M NaCl za 1 litar.

Podloge za određivanje ukupnog broja bakterija u uzorku

Za određivanje ukupnog broja bakterija u uzorku korišćeni su Tryptic Soya Broth čvrsti medijum (TSA) i Reasoner's 2A čvrsti (R2A) medijum. TSA medijum sadrži: 30g Tryptic Soya Broth i 15g agara na 1 l destilovane vode. R2A medijum sadrži: 0.5g proteose peptona, 0.5g casamino acids, 0.5 g kvašćevog ekstrakta, 0.5 g dekstroze, 0.5g rastvorljivog skroba, 0.3g K_2HPO_4 , 0.05g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3g natrijum piruvata i 15g agara u 1 litru destilovane vode (6). Oba medijuma su sterilisana autoklaviranjem – 15 minuta, na 121°C.

Da bi se sprečio rast gljiva, u sterilisane medijume je dodavan cikloheksimid. Na jedan litar podloge dodavano je 10 ml stoka cikloheksimida koncentracije 5 mg/ml. Cikloheksimid je sterilisan filtriranjem kroz 0.22 μm filter i dodavan je u medijume neposredno pre izlivanja u pripremljenje i adekvatno obeležene Petri šolje, kada je temperatura medijuma bila ~40°C. Na ovaj način se izbegava degradacija i samim tim gubljenje efikasnosti cikloheksimida. Izlivanje čvrstih podloga je rađeno u sterilnim uslovima, tj. u laminaru.

Zasejani uzorci su inkubirani 1-3 dana na 30°C.

Određivanje ukupnog broja bakterija u uzorku

Kako bi se odredio broj bakterija koje formiraju kolonije (*eng.* colony forming units, CFU) tj. ukupan broj bakterija u gramu zemljišta, potrebno je dovoljno razblažiti uzorak kako rast jedne kolonije ne bi inhibirao rast drugih kolonija na Petri šolji. Uzorak zemljišta (1g) je razblaživan i zasejavana su serijska razblaženja u duplikatu, a broj CFU u gramu zemljišta određivan je na sledeći način:

$CFU = \text{broj kolonija na Petri šolji} / (V \times \text{razblaženje})$,

gde je V volumen uzorka zasejan na Petri šolju određenog razblaženja.

Podloga za selekciju bakterija rezistentnih na metale i testiranje rezistencije na odabrane metale

Rezistencija bakterijskih izolata na teške metale testiran je na Metal Toxicity medijumu (MTM) (7). MTM se sastojao od 10.93 g PIPES, 5.1g natrijum laktata, 2.13g Na₂SO₄, 1g NH₄Cl, 0.05 g ekstrakta kvasca, 0.5g triptona, 1g CaCl₂, 1g MgSO₄·7H₂O i 15g agar na 1 litar destilovane vode. Vrednost pH medijuma je podešena na pH 7.2 pre dodavanja agara. Medijum je sterilisan autoklaviranjem, 15 min na 121°C. Magnezijum sulfat i kalcijum hlorid su sterilisani odvojeno i dodavani su posle autoklaviranja ostatka medijuma. Sterilni natrijum laktat je takođe dodavan po sterilizaciji ostatka medijuma.

Neposredno pre izlivanja podloga u MTM čvrsti medijum dodavno je i olovo u vidu PbCl₂. Finalna koncentracija Pb u medijumu je bila 30 mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l, 500 mg/l i 1000 mg/l.

Zasejani uzorci su inkubirani 1-3 dana na 30°C.

Zasejavanje na podloge

Metodom utrljavanja, na oba medijuma je zasejano, u duplikatu, po 100 µl 10⁻³ razblaženja i 10⁻⁴ razblaženja bakterija. Kako su 10⁻³ i 10⁻⁴ razblaženja napravljena dodavanjem 1 ml originalnog, 10⁻² razblaženja u 9 ml PBS-a, odnosno 1 ml 10⁻³ razblaženja u 9 ml vode, zasejavanjem po 100 µl dobijena su 10⁻⁵ i 10⁻⁶ razblaženja bakterija. Na isti način je zasejano i 250 µl 10⁻³ razblaženja na MTM čvrste podloge koje su sadržale metale, tj. olovo.

Bakterije koje su izrasle na MTM medijumu sa dodatim olovom u finalnoj koncentraciji od 100 mg/l presejane su na TSA medijum korišćenjem mikrobiološke igle (eze) i inkubirane na 30°C. Za dalje testiranje rezistencije na olovo, bakterije su sa TSA medijuma presejavane na MTM medijum sa većim koncentracijama olova (200 mg/l, 500 mg/l i 1000 mg/l).

Priprema uzorka za hemijsku analizu prisustva metala

Uzorak zemlje za hemijsku analizu prisustva metala pripremljen je na sledeći način: 10 g zemljišta je resuspendovano u 100 ml destilovane vode (10^{-1} razblaženje) i snažno mućkano 30 minuta. Čestice zemljišta su uklonjene centrifugiranjem 20 minuta na 10000 rpm (*eng.* rotation per minute) u SS34 rotoru (Sorvall RC-5B Refridgarated Superspeed Centrifuge). Posle centrifugiranja vodeni rastvor je odliven i korišćen za analizu.

Čuvanje bakterija za budući rad

Radi čuvanja bakterija za dalji rad, odabrani bakterijski izolati su zasejani u tečni Tryptone Soy Broth medijum (TSB), inkubirani prekonoci na 30°C, na 180 obrtaja po minuti. Potom je u 800 µl prekonoćne kulture dodat sterilni glicerol. Tako pripremljeni stokovi bakterija su zatim čuvani na -20°C.

Hemijska analiza uzorka

Hemijska analiza rastvora vršena je metodom plamene atomske apsorpcione spektrometrije. Uzorak je testiran na prisustvo Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Cu i Zn. Plamena apsorpciona spektrometrija je urađena na aparatu Carl Zeiss AAS3 na Fizičko-hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

REZULTATI ISTRAŽIVANJA I DISKUSIJA

Odabir mesta uzorkovanja zemljišta

Na osnovu rezultata detaljnog trogodišnjeg istraživanja zemljišta, koje je sproveo Ministarstvo životne sredine, rudarstva i prostornog planiranja Republike Srbije i koje je pokazalo da su u zemljištu beogradskih parkova koncentracije potencijalno štetnih metala, kao što su As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Cu i Zn (5) iznad maksimalno dozvoljenih vrednosti, za izolaciju bakterija rezistentnih na metale izabran je Kalemegdanski park.

Utvrđivanje ukupnog broja bakterija

Nijedan medijum koji se skoristi za izolaciju i gajenje bakterija ne omogućava izolaciju svih prisutnih bakterija u uzorku. Da bi odredili broj bakterija u zemljištu odabrana su dva medijuma – TSA i R2A. TSA medijum je često korišćen standardni medijum za izolaciju bakterija, koji omogućava izolaciju bakterija bržeg rasta. R2A medijumu je korišćen za izolaciju bakterija sporijeg rasta čiji rast može biti suprimiran bakterijama bržeg rasta na bogatom medijumu kao što je TSA. Rezultati zasejavanja razblaženja bakterija i izračunat broj bakterija po gramu zemljišta prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Broj bakterija u jednom gramu analiziranog zemljišta

Table 1. Number of bacteria in one gram of soil

Medijum	Razblaženje	Broj kolonija (I Petri šolja)	Broj kolonija (II Petri šolja)	Izračunat broj bakterija po razblaženju	Ukupan broj bakterija
TSA	10^{-5}	19	25	$2,2 \times 10^{+6}$	$2,85 \times 10^{+6}$
	10^{-6}	3	4	$3,5 \times 10^{+6}$	
R2A	10^{-5}	111	122	$11 \times 10^{+6}$	$1,15 \times 10^{+7}$
	10^{-6}	14	10	$12 \times 10^{+6}$	

Iz priloženih rezultata vidi se da je četiri puta veći broj bakterija porastao na R2A medijumu, što se poklapa sa literaturnim podacima koji ukazuju da veći broj bakterija izraste na R2A medijumu u odnosu na TSA (8). Mada treba imati na umu da postoje i literaturni podaci koji ne ukazuju na prednosti R2A medijuma i prisustvo razlika (9), te da bi moguće uzroke ove razlike trebalo utvrditi.

Hemijska analiza

Kako je osnovni cilj rada izolacija bakterija rezistentnih na povišene koncentracije metala bilo je neophodno analizirati zemljište na prisustvo teških metala. Osetljivost metode plamene apsorpcione atomske spektrometrije, kojom je moguće detektovati prisustvo metala u uzorku i u vrlo malim količinama je bio razlog za njen odabir za metodu hemijske analize. Uzorak zemljišta, pripremljen na način koji je opisan u poglavlju Materijal i metode rada, je analiziran na prisustvo Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Cu i Zn, kao najčešće i zakonski regulisane zagađivače zemljišta (10).

Rezultati plamene apsorpcione atomske spektrometrije uzorka su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2. Izmerene koncentracije metala u uzorku zemljišta
 Table 2. Measured amounts of heavy metals in the soil sample

Metal	Maksimalno dozvoljene količine (mg/kg)	Izmerene količine (mg/l)
Pb	100	30
Zn	100	1

Izmerene količine olova su bile ispod zakonom propisanog dozvoljenog maksimuma Republike Srbije, dok je količina cinka bila gotovo zanemarljiva. Ostali metali nisu detektovani ovom metodom. Ovaj rezultat je u neku ruku iznenađujuć, s obzirom na rezultate koje je iznelo Ministarstvo za zaštitu životne sredine, rudarstva i prostornog planiranja. Jedno od objašnjenja za ovakve razlike nalazi se u činjenici da vrednosti koje su utvrđene u istraživanju Ministarstva nisu prikazane za svako analizirano zemljište u parkovima Beograda, već kao procenat zemljišta u kom su pronađene povišene koncentracije metala. Tako npr. iako 40.9% parkova u zemljištu sadrži olovo u količinama iznad propisanih, čak i do deset puta višim (5), u izabranom uzorku količina olova je bila u okviru dozvoljenih količina.

Izolacija bakterija rezistentnih na olovo

Da bi utvrdili da li i u ovakvom zemljištu postoje bakterije koje su rezistentne na metale, tačnije olovo, uzorak zemljišta koji je pripremljen na već opisan način zasejan je na MTM medijum koji je sadržao izmerenu količinu olova (30mg/l) u obliku PbCl_2 . Na MTM+Pb (30mg/l) podlogu zasejano je $250 \mu\text{l } 10^{-3}$ razblaženja, u duplikatu. Posle inkubacije na 30°C , prebrojane su formirane kolonije i izračunato je da 2.2×10^6 bakterija raste u prisustvu 30 mg/l olova, što predstavlja 19.1% ukupnog broja bakterija. Istovremeno je $250 \mu\text{l } 10^{-3}$ razblaženja, u duplikatu, zasejano na MTM medijum sa 100 mg/l olova (maksimalo dozvoljena količina). Na ovim podlogama su izrasle 32 kolonije (19 kolonija na jednoj i 13 kolonija na drugoj Petrijevoj šolji). Izračunato je da 6.4×10^4 bakterija u gramu analiziranog zemljišta može da raste u prisustvu 100 mg/l, što čini oko 0.5% bakterija izolovanih iz zemljišta.

Testiranje na povišenim koncentracijama

Trideset i dva dobijena bakterijska izolata na MTM+Pb (100 mg/l) podlozi su dalje testirana na dvostruko većoj, odnosno pet i deset puta većoj koncentraciji olova. Pre testiranja na povišene koncentracije, izolati su presejani na TSA medijum, u kom nema štetnog olova radi podsticanja rasta. Od 32 bakterije presejana su 29 izolata (tri izolata su bila suviše sitna). Tri

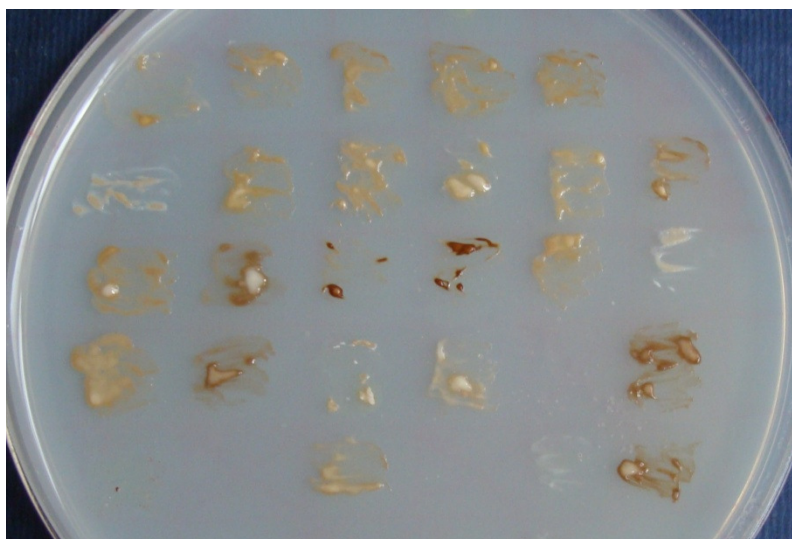
izolata nisu porasla na bogatom medijumu najverovatnije zato što su zbog svoje veličine neuspešno presejani. Bakterije koje su porasle na TSA medijumu, njih 26, presejene su na MTM+Pb (200 mg/l), MTM+Pb (500 mg/l) i MTM+Pb (1000 mg/l) podloge i inkubirane na 30°C dva dana. U Tabeli 3 prikazano je koliko je od testiranih izolata izraslo na ovim podlogama.

Tabela 3. Broj izolata koji su izrasli na MTM podlogama sa povišenim koncentracijama olova
Table 3. Number of isolated bacteria on higher lead concentrations

Koncentracija olova u MTM podlozi (mg/l)	200	500	1000
Broj izolata	26	25	22

Nivo rezistencije koji je utvrđen na MTM medijumu sa dodatkom olova je u skladu sa literaturnim podacima (11,12). Svakako treba napomenuti da su bakterije daleko slabije rasle u prisustvu olova nego na bogatoj podlozi bez njega, što je bilo i očekivano. Na slici 1. prikazana je MTM podloga sa 1000 mg/l (1 g/l) olova i rast izolata. Može se uočiti da postoji razlika i među samim izolatima u pogledu rasta.

Slika 1. Bakterijski izolati na MTM podlozi sa 1000 mg/l olova.
Figure 1. Bacterial isolates on MTM with 1000 mg/l of lead



Da bi utvrdili da li neki od ovih bakterijskih izolata može naći svoju primenu u bioremedijaciji neophodno ih je pre svega testirati na još više koncentracije olova, ali i ispitati da li su rezistentne i na neke druge teške metale, jer je često u zagađenom zemljištu prisutno više teških metala. Dalja istraživanja bi svakako uključivala i identifikaciju ovih bakterija kao i proučavanje mehanizma rezistencije.

ZAKLJUČCI

1. Hemijskom analizom utvrđeno je samo prisustvo olova (30 mg/l) i cinka (1 mg/l) u uzorku.
2. Ukupan broj bakterija u jednom gramu zemljišta je 1.15×10^7 (na R2A medijumu).
3. Na MTM medijumu sa olovom u koncentraciji od 100 mg/l (maksimalno dozvoljena količina prema propisima Republike Srbije) izolovane su 32 bakterije, što čini 0,5% ukupnog broja bakterija u jednom gramu uzorkovanog zemljišta.
4. Svih 26 testiranih izolata je poraslo na podlozi u prisustvu 200 mg/l olova. U prisustvu 500 mg/l olova poraslo je 25 bakterija, a na podlozi sa 1000 mg/l porasle su 22 bakterije.
5. Utvrđivanje stvarnog potencijala izolovanih bakterija za primenu u bioremedijaciji zahteva dalja istraživanja koja bi uključila određivanje maksimalne koncentracije olova na koju su izolovane bakterije rezistentne, identifikaciju bakterija, utvrđivanje mehanizma rezistencije, kao i ispitivanje rezistencije ovih bakterija i na druge teške metale.

ZAHVALNOST

Želimo da izrazimo zahvalnost mr Draganu Rankoviću sa Katedre za Spektrohemiju Fizičko-hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na urađenoj hemijskoj analizi.

LITERATURA

- [1.] Guo, Z., Megharaj, M., Beer, M., Ming, H., Rahman, M.M., Wu, W., Naidu, R., 2009. *Heavy metal impact on bacterial biomass based on DNA analyses and uptake by wild plants in the abandoned copper mine soils*. **Bioresour. Technol.** **100**, 3831–3836.
- [2.] Evanko, C.R., Dzombak, D.A., 1997. *Remediation of Metals-Contaminated Soils and Groundwater. Technology Evaluation Report*. Gwrtac E Series, Pittsburgh
- [3.] Wei, G., Fan, L., Zhu, W., Fu, Y., Yu, J., Tang, M., 2009. *Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWS33-2 isolated from root nodule of Lespedeza cuneata in gold mine tailings in China*. **J. Hazard. Mater.** **162**, 50-56.
- [4.] Piotrowska-Seget, Z., Cycoń, M., Kozdrój, J., 2005. *Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil*. **Appl. Soil Ecol.** **28**, 237-246.
- [5.] www.sepa.gov.rs/download/Stanje_zemljista.pdf
- [6.] Reasoner, D.J., Blannon, J.C. and Geldreich, E.E. 1979. *Rapid seven-hour fecal coliform test*. **Appl. Environ. Microbiol.** **38**, 229-36
- [7.] Sani, R.K., Geesey G., Peyton B.M., 2001. *Assessment of Lead Toxicity to Desulfovibrio desulfuricans G20: Influence of Components of Lactate C Medium*. **Advances in Environmental Research** **5**, 269-276
- [8.] Gournal, R. A., Yahya M. T., Gerba C. P., Shadman F., 1991. *Oligotrophic bacteria in ultra-pure water systems: Media selection and process component evaluations*. **J. Industrial Microbiol. Biotechnol.**, **8**, 223-227
- [9.] Dybwad M., Granum P.E., Bruheim P., Blatny J.M., 2012. *Characterization of Airborne Bacteria at an Underground Subway Station*. **Appl. Environ. Microbiol.** **78**, 1917-1929
- [10.] Službeni glasnik Republike Srbije br.23/94
- [11.] Lu W.-B., Shi J.-J., Wang C.-H., Chang J.-S., 2006. *Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate Enterobacter sp. J1 possessing high heavy-metal resistance*. **J. Hazard. Mater.** **B134**, 80–86
- [12.] Roane T.M., 1999. *Lead Resistance in Two Bacterial Isolates from Heavy Metal–Contaminated Soils*, **Microb. Ecol.**, **37**, 218-224